

09/849,980

09/381810 20.04.98

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D	19 JUN 1998
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年 3月28日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9年特許願第094845号

出 願 人

Applicant (s):

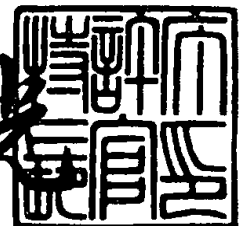
参天製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 6月 5日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3042496

【代理人】

【識別番号】 100104813

【弁理士】

【氏名又は名称】 古谷 信也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 1

【援用の表示】 平成9年3月28日提出の包括委任状

---

このような水チャンネル活性を有する膜タンパク質としては、アクアポリン (AQP) として知られている一群の膜タンパク質が単離されている。また、現在までに、幾つかのアクアポリンの遺伝子がクローニングされ、AQP 1~5、FA-CHIP、AQP- $\gamma$  TIP等のアクアポリンが哺乳類、両生類、植物等から発見されている (例えば、佐々木成、「医学のあゆみ」、173巻、9号、1995年)。

## 【0004】

アグレ (P. Agre) らは、SCIENCE誌 (vol. 256、385-387頁、1992年) において、後にAQP 1と称されることになるCHIP 28のインビトロ転写RNAを注入されたアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞が水透過性を上昇させることを報告している。バンオスト (B. A. van Oost) らは、SCIENCE誌 (vol. 264、92-95頁、1994年) において、ヒトAQP 2のアミノ酸配列を開示し、このものがバソプレシンに依存した尿の濃縮に関与することを示唆している。

## 【0005】

石橋らは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌 (91巻、6269-6273頁、1994年) において、腎集合管由来のAQP 3の遺伝子の塩基配列を開示し、コードされるアミノ酸配列を記載している。石橋らは、AQP 3のcRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞の水透過性を測定して水チャンネル活性を確認している。石橋らは、このAQP 3は、水のみならず、尿素やグリセロール等の非イオン性小分子をも輸送することを報告している。

## 【0006】

ユング (J. S. Jung) らは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌 (91巻、13052-13056頁、1994年) において、AQP 4を単離したことを報告している。このAQP 4は、哺乳類の脳中に最も多量に存在し、水銀抵抗性を有することが知られている。レイナ (S. Raina) らは、J. Biol. Chem. 誌 (270巻、1908-1912頁、1995年) において、ラットの唾液腺由来のAQP 5のcDNAを調製し、その塩基配列及びコードするアミノ酸配列を開示している。レイナ (S. Raina) らは

リペプチドでもある。

以下、本発明を詳述する。

【0011】

本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。このポリペプチドは、アスパラギン-プロリン-アラニンの3アミノ酸からなる配列をアミノ酸番号195~197に有している。しかし、従来知られているAQPに共通して見られるような、このアスパラギン-プロリン-アラニン配列が2度出現するという特徴は、本発明のポリペプチドにはみられない。上記ポリペプチドは、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞の水透過性を上昇させることから、水チャンネル活性を有するものであることを確認することができる。

【0012】

上記ポリペプチドは、このポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に基づいて、*in vivo* 又は *in vitro* に構成されたタンパク合成系により翻訳されて生成することができる。本発明のヌクレオチド配列は、上記ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする領域から実質的になり、必要に応じてプロモーター領域等のその他の領域を含んでいてもよい。遺伝情報に基づくタンパク合成は、遺伝子であるDNAの情報がRNAポリメラーゼによるDNAに依存するRNA合成の結果mRNAに転写される。そして、このmRNAが、tRNAを含むタンパク合成系でアミノ酸配列に翻訳される。従って、本発明のヌクレオチド配列は、DNA配列のみならず、RNA配列をも含むものである。また、あるアミノ酸に対応するコドンは、通常、1つ又は複数存在することが知られているので、上記ヌクレオチド配列は唯一のものではなく、同一のアミノ酸をコードする同義の他のコドンで置換されているヌクレオチド配列であってもよいことは当然である。

【0013】

上記ポリペプチドは、配列表の配列番号2に示すDNA配列が有する遺伝情報に基づいて形成することができる。上記ポリペプチドは、上記配列表の配列番号2に示す核酸塩基配列のうち、塩基番号173~1198でコードされている。

下、上記 cDNA をヒト脂肪組織からクローニングして得る方法を、詳細に説明する。

#### 【0016】

上記方法としては、例えば、Biochim. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996) 等に記載されている方法等が知られている。これによれば、まず、脂肪組織から全 RNA を分離し、必要に応じてポリ (A) RNA まで精製する。この精製には、市販の精製キットを使用することができ、例えば、オリゴ (dT) -セルロースと各種のバッファーとを組み合わせたファルマシア社製 Quick prep mRNA purification kit 等を好適に使用することができる。次に、2本鎖 cDNA を pUC19 系のベクタープライマーを用いて合成し、合成した 2本鎖 cDNA を制限酵素 MboI (認識塩基配列: GATC) によって選択的に切断する。このとき、ベクター分子側の GATC 配列は、 $dam^+$  細菌中で複製することによってメチル化をうけて  $G^m$  ATC とすることができるので、MboI で切断されることはない。切断された cDNA を E. coli リガーゼによって自己環状化することにより、ポリ (A) から、最も近い MboI 部位までの cDNA のフラグメントを含むプラスミドが完成する。このプラスミドを大腸菌に入れて培養し、形質転換させた大腸菌のコロニーを選択する。次に、適当な PCR プライマーを使用して上記コロニー中の cDNA を PCR 法により増幅する。

#### 【0017】

一方、pUC19 系のベクタープライマーを用いて合成した全長の 2本鎖 cDNA を T4 ポリメラーゼを用いて 5' 末端で切断し、T4 リガーゼで環状化した後大腸菌に導入して形質転換させる。こうして形質転換させたコロニーから、上記 3' -directed DNA ライブラリーから上述の方法により得られた脂肪組織に特異的な cDNA をラベル化したものをプローブとして用いてスクリーニングすることにより、所望のコロニーを得る。このコロニー中の挿入 cDNA を適当な PCR プライマーを使用して PCR 法により増幅する。増幅産物を精製してソニケーションした後、M13 ファージ中にサブクローニングする。

#### 【0018】

## 実施例 1

DNAの塩基配列の決定

最近、発現している遺伝子の同定だけではなく、その発現頻度や発現量の検討が可能で、RNAのポリ(A)からその上流の制限酵素MboI部位までの3'末端だけの決められた領域を含む3'-directed DNAライブラリー(Nature Genet., 2, 173-179 (1992))を用いて、脂肪組織に特異的なコラーゲン様因子のDNAをクローニングしたことが報告されている(Biochim. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996))。上記報告に記載された方法に準じ、脂肪組織に特異的な3'-directed DNAライブラリーを用いて、本発明のDNAの塩基配列を決定した。

方法

ヒト脂肪組織からQuick prep mRNA purification kitを用いて分離・精製したポリ(A)<sup>+</sup> RNAに逆転写酵素を加えた後、pUC19系のベクターであるpBluescriptを含むλZAPIIに組み込んで大腸菌に導入した。そこへ、脂肪組織に特異的な部分DNAをプローブとしてスクリーニングを行い、形質転換された大腸菌のコロニーを得た。次いで、2種のプライマー(SK: 5' CGCTCTAGAACTAGTGGATC3'、T7: 5' GTAATACGACTCACTATAGGGC3')とともにPCR(Polymerase Chain Reaction; 95℃で30秒・50℃で30秒・70℃で60秒のサイクルを15サイクルした後、95℃で30秒・70℃で60秒のサイクルを15サイクル)を行い、ソニケーション処理をした後、M13にサブクローニングした。ここへプライマー色素を加え精製した後、自動シーケンサーでDNAの塩基配列を解析した。配列表の配列番号2に得られた塩基配列を示した。

【0023】

## 実施例 2

水透過性についての検討

AQPファミリーの水透過性の検討については、AQPファミリーの遺伝子が

【表1】

	水透過性 (cm/sec)
RNA非導入群	$30.0 \times 10^{-4}$
RNA導入群	$292.5 \times 10^{-4}$

## 【0028】

表1から明らかなように、本発明のDNA配列がコードするポリペプチドは、卵母細胞に注入後、明瞭な水透過性の上昇をもたらした。このことから、本発明のポリペプチドは、水チャンネル活性を有することが判明した。

## 【0029】

## 【発明の効果】

本発明は、新規な水チャンネル活性を有するタンパク質及び上記タンパク質をコードする新規なDNA配列を提供することができる。上記タンパク質は、未だ水チャンネルの存在が報告されていないヒト脂肪組織中から見出されたものである。本発明により、上記組織が関与する水又は脂肪の代謝における疾患の新たな治療方法の開発が可能となる。

Tyr Leu Pro Asp His Met Thr Leu Trp Arg Gly Phe Leu Asn Glu Ala

165

170

175

Trp Leu Thr Gly Met Leu Gln Leu Cys Leu Phe Ala Thr Thr Asp Gln

180

185

190

Glu Asn Asn Pro Ala Leu Pro Gly Thr Glu Ala Leu Val Ile Gly Ile

195

200

205

Leu Val Val Ile Ile Gly Val Ser Leu Gly Met Asn Thr Gly Tyr Ala

210

215

220

Ile Asn Pro Ser Arg Asp Leu Pro Pro Arg Ile Phe Thr Phe Ile Ala

225

230

235

240

Gly Trp Gly Lys Gln Val Phe Ser Asn Gly Glu Asn Trp Trp Trp Val

245

250

255

Pro Val Val Ala Pro Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Gly Gly Ile Ile Tyr

260

265

270

Leu Val Phe Ile Gly Ser Thr Ile Pro Arg Glu Pro Leu Lys Leu Glu

275

280

285

Asp Ser Val Ala Tyr Glu Asp His Gly Ile Thr Val Leu Pro Lys Met

290

295

300

Gly Ser His Glu Pro Thr Ile Ser Pro Leu Thr Pro Val Ser Val Ser

305

310

315

320

Pro Ala Asn Arg Ser Ser Val His Pro Ala Pro Pro Leu His Glu Ser

325

330

335

Met Ala Leu Glu His Phe

340

【0031】

配列番号：2

配列の長さ：1258

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖



Tyr	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Gly	Phe	Gly	Phe	Gly	Val	Thr	Met	Gly	Val	
	70							75						80		
CAC	GTG	GCA	GGC	CGC	ATC	TCT	GGA	GCC	CAC	ATG	AAC	GCA	GCT	GTG	ACC	466
His	Val	Ala	Gly	Arg	Ile	Ser	Gly	Ala	His	Met	Asn	Ala	Ala	Val	Thr	
	85							90						95		
TTT	GCT	AAC	TGT	GCG	CTG	GGC	CGC	GTG	CCC	TGG	AGG	AAG	TTT	CCG	GTC	514
Phe	Ala	Asn	Cys	Ala	Leu	Gly	Arg	Val	Pro	Trp	Arg	Lys	Phe	Pro	Val	
	100							105						110		
TAT	GTG	CTG	GGG	CAG	TTC	CTG	GGC	TCC	TTC	CTG	GCG	GCT	GCC	ACC	ATC	562
Tyr	Val	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Gly	Ser	Phe	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Ile	
	115							120						125		
TAC	AGT	CTC	TTC	TAC	ACG	GCC	ATT	CTC	CAC	TTT	TCG	GGT	GGA	CAG	CTG	610
Tyr	Ser	Leu	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ile	Leu	His	Phe	Ser	Gly	Gly	Gln	Leu	
								135						140		
ATG	GTG	ACC	GGT	CCC	GTC	GCT	ACA	GCT	GGC	ATT	TTT	GCC	ACC	TAC	CTT	658
Met	Val	Thr	Gly	Pro	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Ile	Phe	Ala	Thr	Tyr	Leu	
								150						155		
CCT	GAT	CAC	ATG	ACA	TTG	TGG	CGG	GGC	TTC	CTG	AAT	GAG	GCG	TGG	CTG	706
Pro	Asp	His	Met	Thr	Leu	Trp	Arg	Gly	Phe	Leu	Asn	Glu	Ala	Trp	Leu	
								165						170		
ACC	GGG	ATG	CTC	CAG	CTG	TGT	CTC	TTC	GCC	ATC	ACG	GAC	CAG	GAG	AAC	754
Thr	Gly	Met	Leu	Gln	Leu	Cys	Leu	Phe	Ala	Thr	Thr	Asp	Gln	Glu	Asn	
								180						185		
AAC	CCA	GCA	CTG	CCA	GGA	ACA	GAG	GCG	CTG	GTG	ATA	GGC	ATC	CTC	GTG	802
Asn	Pro	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	Ile	Leu	Val	
								195						200		
GTC	ATC	ATC	GGG	GTG	TCC	CTT	GGC	ATG	AAC	ACA	GGA	TAT	GCC	ATC	AAC	850
Val	Ile	Ile	Gly	Val	Ser	Leu	Gly	Met	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ala	Ile	Asn	
								215						220		
														225		

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 水チャンネル活性を有する新規な膜タンパク質及びこれをコードするDNA配列を提供する。

【解決手段】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有する新規ポリペプチド、分子中に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、配列表の配列番号2に示すDNA配列、及び、配列表の配列番号2に示す塩基配列のうち、塩基番号173～1198でコードされるアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチド。

【選択図】 なし

---

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000177634]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号

氏 名 参天製薬株式会社

---